

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 21/78

G01N 33/68



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410016789.6

[43] 公开日 2005 年 1 月 5 日

[11] 公开号 CN 1560610A

[22] 申请日 2004.3.8

[21] 申请号 200410016789.6

[71] 申请人 王学忠

地址 200125 上海市浦东新区东方路 2993 弄
14 号 102 室

[72] 发明人 王学忠

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称 同型半胱氨酸测定方法及其试剂

[57] 摘要

本发明是关于一种采用循环增量技术的酶学测定方法及其试剂，用于测定体液样本中同型半胱氨酸的含量。其特点是：通过采用一种循环增量技术，提高测定灵敏度，从而能像普通酶学诊断试剂一样对体液样本中的同型半胱氨酸进行自动化测定。体液样本中的同型半胱氨酸在同型半胱氨酸转甲基酶和腺苷同型半胱氨酸酶的作用下与 S-腺苷-L-蛋氨酸反复循环反应，产生腺苷，产生腺苷的速率与样本中同型半胱氨酸的含量成正比，通过测定腺苷的生成速率，就可以达到测定体液样本中同型半胱氨酸含量的目的。采用本方法制备的定量测定试剂具有方便、快捷、自动化、和高灵敏度的特点。

ISSN 1008-4274

- 1、一种测定体液样本中同型半胱氨酸的方法及其试剂，其特征在于：(a) 采用由同型半胱氨酸转甲基酶 (EC 2.1.1.10) 和腺苷同型半胱氨酸酶 (EC 3.3.1.1) 及其底物组成的酶循环反应，被测样本中含有的同型半胱氨酸在此酶循环反应系统的作用下产生腺苷。(b) 该腺苷产生的速率与样本中同型半胱氨酸的含量成正比，通过测定腺苷的方法，可以得出样本中同型半胱氨酸的含量。
- 2、根据权利要求1所述的酶循环反应方法，其中酶是指 *S*-腺苷-*L*-蛋氨酸-*L*-半胱氨酸 *S*-甲基转移酶 (*S*-adenosyl-*L*-methionine-*L*-homocysteine *S*-methyltransferase, EC 2.1.1.10) 和 *S*-腺苷-*L*-同型半胱氨酸酶水解酶 (*S*-adenosyl-*L*-homocysteine hydrolase, EC 3.3.1.1)；底物是指 *S*-腺苷-*L*-蛋氨酸 (*S*-adenosyl-*L*-methionine)。该底物可以是化合物商品，也可以由其它酶反应方法生成。
- 3、根据权利要求1所述的酶循环反应方法，其中还包含还原性含硫化合物，如二硫苏糖醇，单价和二价金属离子，如镁离子、钾离子。
- 4、根据权利要求1所述的一种通过测定腺苷测定同型半胱氨酸的方法，是指过氧化氢生色反应方法 (Trinder's 方法)，其试剂除包含权利要求2所指的酶循环反应物质外，还应包含：腺苷脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶、黄嘌呤氧化酶、过氧化物酶和 Trinder's 色原化合物等物质。
- 5、根据权利要求1所述的一种通过测定腺苷测定同型半胱氨酸的方法，是指氨测定方法，其试剂除包含权利要求2所指的酶循环反应物质外，还应包含：腺苷脱氨酶、谷氨酸脱氢酶、 α -酮戊二酸和还原型辅酶 I 或 II 或其类似物等物质。
- 6、根据权利要求2所述的酶反应生成底物 *S*-腺苷-*L*-蛋氨酸的方法，是指由三磷酸腺苷、蛋氨酸和三磷酸腺苷-*L*-蛋氨酸 *S*-腺苷转移酶 (ATP-*L*-methionine *S*-adenosyltransferase, EC 2.5.1.6) 组成的酶反应系统。

同型半胱氨酸测定方法及其试剂

技术领域:

本发明涉及同型半胱氨酸的测定方法及其试剂

背景技术:

同型半胱氨酸 (Homocysteine) 是含硫氨基酸, 在细胞内由蛋氨酸脱甲基生成。近期的研究表明, 同型半胱氨酸通过产生超氧化物及过氧化物损伤血管内皮细胞, 改变凝血因子功能, 增加血栓形成倾向, 促进动脉粥样硬化及血栓形成, 使心血管疾病发病率及死亡率增加, 因此测定血中同型半胱氨酸的浓度在临床上意义十分重要。当同型半胱氨酸在细胞内积聚, 并进入血液循环后, 大部分以氧化型存在, 并与蛋白结合, 还原型同型半胱氨酸在血中仅占 1%。测定血中总同型半胱氨酸的含量, 一般需采用还原剂将氧化型同型半胱氨酸还原为还原型同型半胱氨酸。

同型半胱氨酸在临床应用中的测定方法主要包括: 高效液相色谱法、酶免疫分析法、荧光偏振法等。上述方法的共同特点是需要特别的测定仪器、操作复杂, 试验耗时较长, 不能应用于临床大流量的自动化分析, 并且价格昂贵。

由于同型半胱氨酸在样本中的含量较低, 常规临床酶学的测定方法无法达到所需的测定灵敏度, 限制了常规方法的采用。在酶学方法测定同型半胱氨酸的技术方面, Naoto Matsuyama 等 (参见美国专利 #6686172) 发明了一种利用同型半胱氨酸转甲基酶和腺苷同型半胱氨酸酶的非循环酶学测定技术, 提高测定灵敏度的方法, 但该方法操作繁琐, 试剂复杂, 测定前需加入巯基化合物, 测定时必须同时进行多项空白测定, 增加了测定方法的不准确性。

本发明公开了一种新的测定体液样本中同型半胱氨酸的酶循环方法, 该方法不受体液样本中干扰物质的干扰, 具有优良的反应灵敏度。并首次采用测定同型半胱氨酸方法中常用的工具酶, 如: 同型半胱氨酸转甲基酶和腺苷同型半胱氨酸水解酶, 用于酶循环增量测定。此外, 本发明同时还首次公开了基于上述两种工具酶的酶循环方法及利用该方法制备的同型半胱氨酸测定试剂, 该试剂可以应用于目前广泛使用的临床自动分析仪, 从而达到大规模测定样本的要求。

发明内容:

本发明提供了一种采用循环增量技术的酶学测定方法及其试剂,

测定体液样本中同型半胱氨酸的含量。该循环增量测定系统主要由同型半胱氨酸转甲基酶和腺苷同型半胱氨酸酶组成。体液样本中的氧化型同型半胱氨酸经还原剂还原后，在同型半胱氨酸转甲基酶（EC 2.1.1.10）的催化作用下，与 S-腺苷-L-蛋氨酸反应，生成 S-腺苷-L-同型半胱氨酸和 L-蛋氨酸。S-腺苷-L-同型半胱氨酸在腺苷同型半胱氨酸酶（EC 3.3.1.1）的作用下水解为 L-同型半胱氨酸和腺苷（见图）。因此，样本中的 L-同型半胱氨酸反复循环反应，不断产生腺苷，腺苷的生成速率与样本中同型半胱氨酸的含量成正比，通过测定腺苷的生成速率，就可以达到测定体液样本中同型半胱氨酸含量的目的。

腺苷的测定方法很多，本发明中仅列举了两种常见的测定腺苷的辅助酶系统：（1）腺苷在腺苷脱氢酶的作用下生成氨和肌苷，后者经嘌呤核苷磷酸化酶作用，与磷酸反应生成次黄嘌呤，在黄嘌呤氧化酶的作用下，次黄嘌呤被最终氧化为尿酸，并产生过氧化物氢，经与生色化合物反应，测定生成的色素；或者（2）采用各种测定氨的方法，如谷氨酸脱氢酶反应方法。氨与 α -酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶的作用下，产生 L-谷氨酸，同时辅酶 NADH 或 NADPH 被氧化为 NAD^+ 或 NADP^+ ，反应系统在 340nm 处的吸光度值下降。由于样本中的同型半胱氨酸反复循环参与反应，不断产生腺苷，故大大提高了测定的灵敏度。

附图说明：

发明的方法学原理：样本中的氧化型同型半胱氨酸（Hcy）经还原剂还原后，在同型半胱氨酸转甲基酶（HcyMetase）的催化作用下，与 S-腺苷-L-蛋氨酸（AdoMet）反应，生成 S-腺苷-L-同型半胱氨酸（AdoHcy）和 L-蛋氨酸（Met）。S-腺苷-L-同型半胱氨酸在腺苷同型半胱氨酸酶（AdoHcyase）的作用下水解为 L-同型半胱氨酸和腺苷（Ado）。反应生成的蛋氨酸与试剂中的三磷酸腺苷（ATP）在蛋氨酸转腺苷酶（MAT）的作用下生成 S-腺苷-L-蛋氨酸（AdoMet）。样本中的 L-同型半胱氨酸反复循环反应，不断产生腺苷，腺苷的生成速率与样本中同型半胱氨酸的含量成正比，通过测定腺苷的生成速率，就可以达到测定体液样本中同型半胱氨酸含量的目的。

大部分同型半胱氨酸在血中都以氧化型存在，其中 80-90% 与蛋白结合，5-10% 与同型半胱氨酸自身结合，另外 5-10% 与半胱氨酸等

结合形成混合型同型半胱氨酸二硫化物；还原形仅占约 1%。测定血中总同型半胱氨酸含量时，普遍采用还原剂还原其结合的二硫键，使其以游离的还原型同型半胱氨酸形式存在。常用的化学还原剂有二巯苏糖醇（DTT）、三-（羧乙基）磷化氢盐酸盐（TCEP）等。还原剂的用量不宜过大，以免干扰测定反应，如 DTT 的用量最好小于 10mM。

此外，含硫还原剂的另一个作用是作为同型半胱氨酸转甲基酶和蛋氨酸转腺苷酶的活性促进剂。

S-腺苷-L-蛋氨酸作为酶循环反应的起始化合物，可以采用商业成品，但由于普通商业品极不稳定，本发明中采用辅助酶系统生成，即由蛋氨酸和 ATP 在蛋氨酸腺苷转移酶的作用下生成 S-腺苷-L-蛋氨酸，引入这一辅助酶系统的另一个优点是可以在主循环反应中进一步促进理想的反应方向，并可降低蛋氨酸的试剂用量。这一辅助酶系统在测定方法学中并不是必需，只要能够提供稳定的 S-腺苷-L-蛋氨酸用于循环测定，任何酶系统或其它方法都是可行的。

本发明首次创建了由同型半胱氨酸转甲基酶和腺苷同型半胱氨酸酶组成的酶循环反应，并应用于同型半胱氨酸的测定。基于酶法循环增量测定的特点，循环反应系统的酶使用量不要求很高，最终反应浓度一般在 0.1~50ku/L 之间，最好在 0.2~10ku/L 之间。当然，增加酶的用量并不影响本发明方法的应用，但会增加试剂的制造成本。优化酶和底物应用量可以促进循环反应向理想的方向进行，在循环机制中 ATP 应过量，并较大于蛋氨酸的用量，可用范围一般在 0.1~90mM/L 之间，最好在 1~80mM/L 范围之内。腺苷同型半胱氨酸酶的用量应大于同型半胱氨酸转甲基酶的用量，蛋氨酸腺苷转移酶的用量最好大于同型半胱氨酸转甲基酶的用量，此外，腺苷脱氨酶应过量。

本发明同时公开了一种测定方法，该方法不受体液样本中腺苷、蛋氨酸、胱硫醚等物质的干扰。

本发明同时还首次提供了两种由同型半胱氨酸转甲基酶和腺苷同型半胱氨酸酶组成的酶循环反应测定试剂，用于测定体液样本中同型半胱氨酸的含量。

利用本发明的酶循环方法，可以按照普通酶学诊断技术制备出各种同型半胱氨酸的诊断试剂。在本发明的一个实施例中，采用过氧化物酶比色方法（也称作 Trinder's 方法），循环系统产生的腺苷在腺苷脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶、黄嘌呤氧化酶的进一步作用下，生成过氧化氢，在过氧化物酶的作用下，过氧化氢与 4-氨基安替比林和氧化生色化合物反应，产生色素。通过检测色素生成的速率，可以计算出

样本中同型半胱氨酸的含量。在临床酶学测定试剂中，常用的氧化生色化合物很多，如：*N*-乙基-*N*-磺基羟丙基-间-甲苯胺（TOOS）、3-羟基-2,4,6-三溴苯甲酸（TBHBA）、*N*-乙基-*N*-(3-磺丙基)-间-甲氧苯胺（ADPS）、*N*-乙基-*N*-(2-羟基-3-磺丙基)-间-甲氧苯胺（ADOS）、*N*-乙基-*N*-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧苯胺（DAOS）等。还有另一类氧化生色物质不需要4-氨基安替比林的偶合。氧化生色化合物的用量一般在0.01~10mM/L，最好在0.5~3mM/L。

在本发明的另一个实施例中，采用测定氨的一种酶学方法。循环系统产生的腺苷在腺苷脱氨酶的作用下产生氨，在谷氨酸脱氢酶辅助测定系统的进一步作用下，还原型辅酶（如：NADH、NADPH、thio-NADH、thio-NADPH等）被氧化为氧化型辅酶，通过监测340nm处光吸收值下降的速率，可以计算出样本中同型半胱氨酸的含量。还原型辅酶的用量一般在0.1~0.8mM/L，最好在0.15~0.4mM/L。

采用本发明循环机制配制的同型半胱氨酸测定试剂中应当包含缓冲液，如：磷酸盐缓冲液、*N*-(2-羟乙基)哌嗪-*N'*-(2-乙基磺酸)（HEPES）缓冲液等，金属离子，如镁离子等反应必需成分，还可含有表面活性剂、络合剂（如：EDTA）和防腐剂等化合物。

上述两种试剂的测定方法，与本专业中常规的应用方法相同，如：可以采用速率法或终点法，通过参照校准品或绘制标准浓度曲线等，计算出被测物的含量，在此不再赘述。本专业技术人员可以根据本发明的原理和方法配制出各种类似的测定试剂，但并不脱离出本发明的原理和应用范围。

具体实施例：

实施例1：采用由同型半胱氨酸转甲基酶和腺苷同型半胱氨酸酶组成的酶循环反应，测定试剂系统产生的过氧化氢生色反应（Trinder's 反应）。

试剂1：（R1:R2 = 3:1）

试剂组份	每升用量	常用每升用量范围
磷酸盐缓冲液，pH7.0，37°C	100mM	10~300mM
EDTA.2Na	0.2mM	0.1~20mM
MgSO ₄	15mM	0.5~100mM
Triton X-100	0.1%	0.01~5%
DTT	2mM	0.1~20mM
ATP	80mM	0.1~90mM
ADA	3ku	0.1~200ku
ADPS	2mM	0.01~20mM

AdoHcyase	10ku	0.1~50ku
甘露糖醇	20mM	1~100mM
氧化型辅酶 NAD	0.1mM	0.01~20mM
蛋氨酸转腺苷酶	15ku	0.1~50ku
嘌呤核苷磷酸化酶	2ku	0.1~50ku
黄嘌呤氧化酶	3ku	0.1~50ku
辣根过氧化物酶	2ku	0.1~50ku
同型半胱氨酸转甲基酶	4ku	0.1~100ku

试剂 2: (R1:R2 = 3:1)

试剂组份	每升用量	常用每升用量范围
磷酸盐缓冲液, pH7.0, 37°C	100mM	10~300mM
EDTA.2Na	0.2mM	0.1~20mM
MgSO ₄	15mM	0.5~100mM
Triton X-100	0.1%	0.01~5%
蛋氨酸	0.5mM	0.1~90mM
4-氨基安替比林	1mM	

实施例 1 试剂 1 配方用于还原氧化型同型半胱氨酸, 排除样本中腺苷的干扰, 同时试剂 1 完整的酶循环测定试剂用于排除副反应。测定样本时, 采用固定时间法, 试剂与样本的比例没有固定要求, 但同一测定批次内应一致。如试剂 1:样本:试剂 2 为 300:20:100, 温度 37°C, 测定波长 540nm, 试剂 1 加样本或校准品后在测定温度孵育 300 秒, 除去样本中的腺苷干扰, 然后加入试剂 2 开始测定, 延迟时间 0~120 秒, 可用于排除样本中其它 S-腺苷-L-蛋氨酸→S-腺苷-L-同型半胱氨酸的副反应, 测定时间 180~300 秒, 读数在测定时间内选择至少 2 个有效点。

实施例 2: 采用由同型半胱氨酸转甲基酶和腺苷同型半胱氨酸酶组成的酶循环反应, 通过氨试剂方法, 测定固定时间段内还原型辅酶被氧化的速率。

试剂 1: (R1:R2 = 4:1)

试剂组份	每升用量	常用每升用量范围
磷酸盐缓冲液, pH6.5, 37°C	150mM	500~500mM
EDTA.2Na	0.5mM	0.1~20mM
MgSO ₄	15mM	0.5~100mM

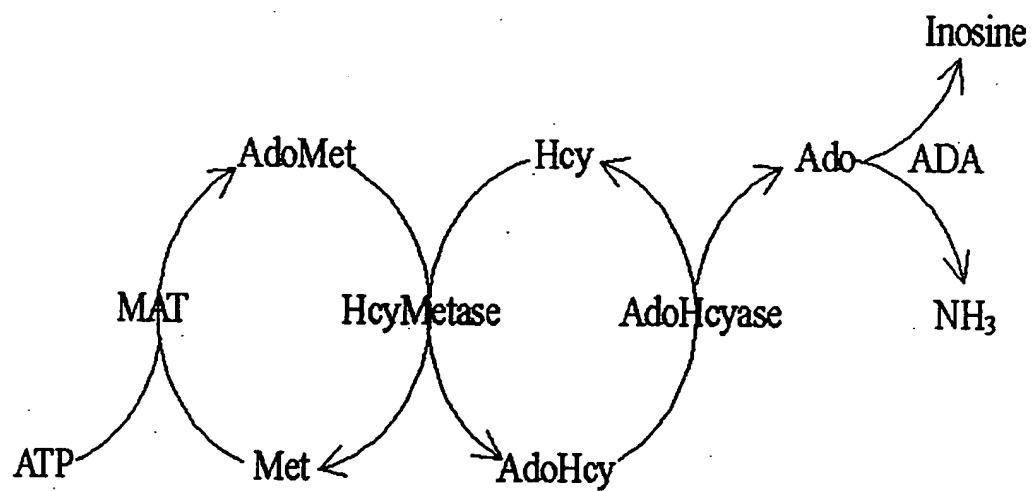
DTT	1.5mM	0.1~20mM
ATP	80mM	0.1~90mM
ADA	3ku	0.1~200ku
AdoHcyase	10ku	0.1~50ku
牛血清白蛋白	0.2%	0.01~10%
α -酮戊二酸	7.5mM	1~20mM
蛋氨酸转腺苷酶	15ku	0.1~100ku
谷氨酸脱氢酶	5ku	1~50ku
同型半胱氨酸转甲基酶	5ku	0.1~50ku

试剂 2: (R1:R2 = 4:1)

试剂组份	每升用量	常用每升用量范围
HEPES 缓冲液, pH8.3, 37°C	50mM	10~200mM
EDTA.2Na	0.5mM	0.1~20mM
MgSO ₄	15mM	0.5~100mM
蛋氨酸	10mM	0.1~90mM
甘露糖醇	20mM	1~100mM
还原型辅酶 NADH	0.8mM	0.1~10mM
乳酸脱氢酶	2ku	0.5~20ku

实施例 2 试剂 1 配方用于还原氧化型同型半胱氨酸, 试剂 2 与试剂 1 组合成完整的酶循环测定试剂。测定样本时, 采用固定时间法, 试剂与样本的比例没有固定要求, 但同一测定批次内应一致。如试剂 1:样本:试剂 2 为 200:25:50, 温度 37°C, 测定波长 340nm, 试剂 1 加样本或校准品后在测定温度孵育 300 秒, 然后加入试剂 2, 延迟 60~120 秒, 排除样本中氨和丙酮酸的干扰, 以及其它 S-腺苷-L-蛋氨酸→S-腺苷-L-同型半胱氨酸的副反应, 测定时间 180 秒, 读数在测定时间内选择至少 2 个有效点。

上述实施例试剂的配制方法仅用于说明本发明的原理及其应用, 本发明绝不局限于上述举例的应用范围; 此外, 在本发明相关领域中的专业技术人员, 可以根据本发明的原理和方法配制出与之类似的各种测定试剂, 但并不脱离出本发明的原理和应用范围。



46699-2001400-10361

DELPHION

[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)**RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**[My Account](#)[Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help](#)

The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: ☒ PDF | [File History](#) | [Other choices](#)Tools: [Add to Work File](#) [Create new Work File](#) [Add](#)View: Jump to: [Top](#) [Go to: Derwent](#)☒ [Email this to a friend](#)**Title:** CN1560610A: Homotypic cysteine measuring method and its reagent**Derwent Title:** Homotypic cysteine measuring method and its reagent [\[Derwent Record\]](#)**Country:** CN China**Kind:** A Unexamined APPLIC. open to Public inspection I**Inventor:** XUEZHONG WANG; China**Assignee:** WANG XUEZHONG China[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)High
Resolution**Published / Filed:** 2005-01-05 / 2004-03-08**Application Number:** CN2004010016789**IPC Code:** G01N 21/78; G01N 33/68;**ECLA Code:** None**Priority Number:** 2004-03-08 CN2004010016789**Abstract:**

The invention relates to an enzymology measuring method and reagent with circular increment technology, applied to measure the content of homeotypic cysteine in the measured sample. The character is: with a circular increment technology, increases the measurement sensitivity, thus it can carries on automatic measurement to the homeotypic cysteine in the sample liquid like normal enzymology diagnosing agent. The homeotypic cysteine in the sample liquid reacts with the S-adenosine-L-methionine repeatedly and circularly under the effect of homeotypic cysteine methyl kinase and adenosine homeotypic cysteine, generates the adenosine, the speed of the adenosine generation is in direct proportion to the homeotypic cysteine in the sample, through the

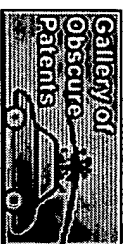
generation speed, the aim to measure the content of the homotypic cysteine in sample can be achieved.

Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1560610A	2005-01-05	2004-03-08	Homotypic cysteine measuring method and its reagent
1 family members shown above				

Other Abstract Info:

DERABS C2005-263493

[Nominate this for the Gallery...](#)

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation
[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)